

Оптическая диагностика опухолевых клеток на разных стадиях развития патологии

Л.С.Щеглова, Л.Л.Абрамова, В.С.Маряхина

Описаны различия оптических и биофизических свойств клеток опухоли молочной железы, выделенных из опухолей различного диаметра. Показано, что спектральные и спектрально-кинетические свойства флуоресцентных зондов в клетках, выделенных из опухолей диаметрами 1–3 см, существенно различны. Так, коэффициент экстинкции родамина 6G с развитием патологии постепенно увеличивается. В то же время скорость взаимодействия триплетных состояний молекул-зондов с кислородом, растворённым в цитоплазме опухолевых клеток, с увеличением диаметра капсулы опухоли уменьшается. Полученные закономерности могут быть связаны с изменением структуры клеток и их биохимических и биофизических свойств. Представленные данные могут быть полезны для развития оптических методов диагностики патологических состояний биотканей.

Ключевые слова: флуоресцентная диагностика, опухоль, молекулярные зонды, длительная люминесценция.

1. Введение

Оптические методы диагностики широко используются в биологии и медицине для обнаружения патологических состояний биотканей. Наибольшее распространение получили оптическая когерентная томография [1], спектроскопия диффузного отражения [2], флуоресцентная спектроскопия [3]. Однако, поскольку существующие методы не позволяют обнаруживать опухоль на очень ранней стадии, часто ее удаётся идентифицировать лишь тогда, когда капсула уже сформировалась и началось метастазирование. В связи с этим до сих пор остается актуальным совершенствование оптических методов ранней диагностики злокачественных образований.

Известно [4], что нормальные и опухолевые клетки различаются количеством растворённых в цитоплазме белков и углеводов, а также стационарной концентрацией кислорода в них. Изменения в клетках происходят постепенно, на протяжении всего процесса капсулообразования. Ранее в работе [5] нами были показаны изменения кинетики замедленной флуоресценции молекулярных зондов, локализованных в клетках опухолевой и здоровой тканей молочной железы. В настоящей работе спектральными методами исследованы изменения, происходящие в опухолевых клетках на разных стадиях развития патологии, с целью повышения чувствительности оптической биомедицинской диагностики.

Л.С.Щеглова, В.С.Маряхина. Оренбургский государственный университет, Россия, 460018 Оренбург, просп. Победы, 13; e-mail: valemar@mail.ru

Л.Л.Абрамова. Оренбургский государственный аграрный университет, Россия, 460014 Оренбург, ул. Челюскинцев, 18

Поступила в редакцию 23 марта 2013 г., после доработки – 16 июля 2013 г.

2. Объекты и методы исследования

2.1. Спектрофлуориметрия и спектрофотометрия

Объектом исследования являлись клетки молочной железы самок мышей линии BYRB, для которых характерно возникновение спонтанных раковых опухолей молочной железы. Во время операции из капсул опухолей различного диаметра (1–3 см) отбирались кусочки ткани. Фрагменты нормальной ткани молочной железы были взяты от здоровых самок мышей той же линии. Кусочки опухолевой и здоровой тканей помещались в раствор коллагеназы в фосфатном буфере (рН = 7.4) с концентрацией 0.5 мг/мл и выдерживались 40 мин при 37 °С для получения клеточной суспензии, которая затем очищалась от молекул фермента центрифугированием в течение 10 мин при скорости 3000 об./мин. К полученной суспензии клеток добавляли аликвоту раствора родамина 6G. Конечная концентрация красителя в клеточной суспензии составляла 2.9×10^{-5} М. Спектры поглощения клеток и красителя, а также спектры флуоресценции красителя измерялись на спектрофлуориметре SOLAR CM-2203, работающем попеременно в спектрофотометрическом и спектрофлуориметрическом режимах. Спектры поглощения клеток измерялись относительно спектра фосфатного буфера, а красителя – относительно спектра неокрашенной клеточной суспензии (спустя 10 мин после добавления раствора красителя). Длина волны возбуждающего излучения во время флуориметрических измерений составляла 515 нм. Для получения достоверных результатов использовалось не менее 10 самок мышей для каждого вида образцов.

2.2. Лазерный флэш-фотолиз

Для спектрально-кинетических измерений полученная суспензия клеток высаживалась на поверхность твердой питательной среды (биоматериал «Гиаматрикс» [6]) и культивировалась при 37 °С в течение суток [7]. Фрагменты

биоматериала с клетками окрашивались эритрозинном с исходной концентрацией 10^{-4} М. Выбор данного класса красителей обусловлен их спектрально-люминесцентными характеристиками: высоким квантовым выходом в триплетное состояние, интенсивной замедленной флуоресценцией (ЗФ) и фосфоресценцией [8], хорошей растворимостью в воде, способностью проникать внутрь клеток и селективно связываться с белками [9].

Основу установки для исследования кинетики затухания ЗФ и фосфоресценции молекул красителей составлял твердотельный YAG:Nd-лазер, работающий в импульсно-периодическом режиме. Для возбуждения молекул использовалась вторая гармоника излучения лазера ($\lambda_{ex} = 532$ нм). Длительность импульсов составляла 10 нс, энергия импульса варьировалась в пределах 10–50 мДж. Замедленная флуоресценция зондов регистрировалась через монохроматор МДР-41 с помощью ФЭУ-84. Образцы для исследования помещались в специальную вакуумируемую камеру. Давление воздуха над поверхностью окрашенного биополимера варьировалось от 300 до 760 мм. рт. ст. Измерения осуществлялись на автоматизированной установке, включающей ПК и крейт КАМАК, с длительностью фронта переходной характеристики 200 нс [6]. Регистрируемый сигнал кинетики ЗФ представлял собой среднеарифметическую кривую пяти накопленных импульсов. В экспериментах использовалось не менее 10 самок мышей для каждого вида клеток.

2.3. Оптическая микроскопия

Размеры и формы клеток определяли методом оптической микроскопии. Фрагменты биоматериала с клетками фиксировали на предметном стекле и окрашивали гематоксилином и эозином. Измерения проводили на оптическом микроскопе Micros MSD 500, оснащенный цифровой камерой JEM-7A при увеличении 1600.

3. Результаты и их обсуждение

На рис.1 приведены спектры поглощения суспензии клеток молочной железы. Отчётливо виден рост максимума в районе 420 нм в опухолевых клетках с увеличением размера капсулы опухоли. Однако в здоровых клетках поглощения в этом диапазоне спектра не наблюдается. Данную закономерность можно объяснить увеличением содержания порфиринов в опухолевых клетках [10]. С развитием патологии их концентрация растёт и, как след-

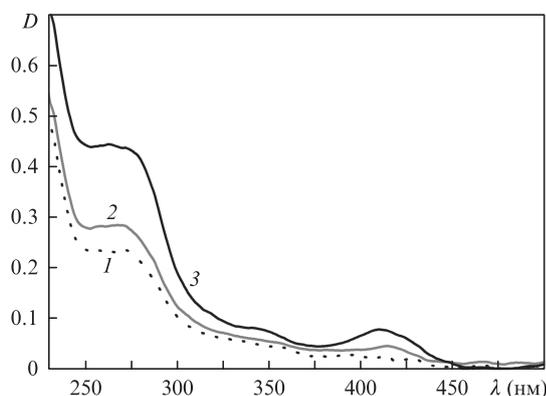


Рис.1. Спектры поглощения суспензии клеток нормальной ткани молочной железы (1) и опухолевых клеток, выделенных из капсул опухолей размерами 1 (2) и 3 см (3).

ствие, появляется дополнительный максимум поглощения на $\lambda = 420$ нм. Последовательное увеличение поглощения в УФ области свидетельствует о росте количества белковых молекул [4] в опухолевых клетках. Различия в спектрах поглощения наблюдаются даже в клетках, выделенных из капсулы опухоли размером 1 см.

Измерения кинетики ЗФ также показали её высокую чувствительность к стадии развития патологии (рис.2). Поскольку кривые представляют собой суммарный сигнал от термозамедленной флуоресценции и бимолекулярных процессов (триплет-триплетной и синглет-триплетной аннигиляции [5]), вид экспериментальных кривых в полулогарифмических координатах позволяет вычислить константу скорости реакции аннигиляции триплетных состояний зонда с образовавшимся синглетным кислородом $^1\Delta_g(O_2)-T$ (реакция синглет-триплетной аннигиляции). В первые 100 мкс зависимости имеют линейный характер. Тангенс угла их наклона в этом временном диапазоне определяет квазиномолекулярную константу скорости реакции аннигиляции, которая связана с истинной константой скорости аннигиляции соотношением $k_{an} = k'_{an}N_{\Delta}$, где k'_{an} – истинная константа скорости бимолекулярной реакции; N_{Δ} – концентрация синглетного кислорода.

С увеличением капсулы опухоли константа скорости реакции аннигиляции в клетках уменьшается. Причем её значения для здоровых и для опухолевых клеток, выделенных из капсулы размером 1 см, сопоставимы (табл.1). С увеличением размера опухоли эти различия становятся более существенными. Изменяется и чувствительность величины k_{an} молекул-зондов к варьированию давления воздуха над поверхностью окрашенных клеток. При изменении давления от 300 до 760 мм. рт. ст. k_{an} в клетках из опухоли размером 3 см меняется в среднем на 27%, тогда как в здоровых клетках – на 38%.

Уменьшение k_{an} с развитием патологии может быть обусловлено гипоксией опухолевых клеток [10]. В то же время в работе [11] показано, что в опухолевых клетках вязкость цитоплазмы значительно выше. Это приводит к уменьшению коэффициента диффузии молекул красителя в цитоплазме и, как следствие, константы скорости аннигиляционных процессов.

Помимо изменений в биохимическом составе опухолевых клеток вероятны метаморфозы и в органоидах. Известно [12], что родаминовые красители проникают внутрь клеток и связываются с митохондриями – органо-

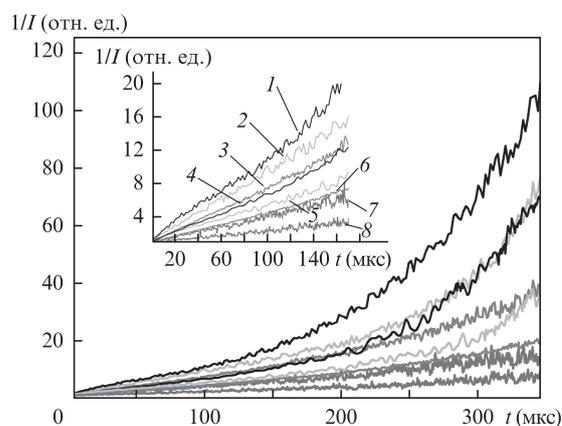


Рис.2. Кинетика ЗФ эритрозина в здоровых клетках (1, 4) и в опухолевых клетках, выделенных из капсул опухолей размерами 1 (2, 5), 2 (3, 6) и 3 см (7, 8) при давлении 300 (4, 5, 6, 7) и 760 мм рт. ст. (1, 2, 3, 8). Исходная концентрация зонда 10^{-4} М.

Табл.1. Константы скорости аннигиляционных процессов с участием триплетных молекул эритрозина в опухолевых и нормальных клетках молочной железы.

Клетки	$k_{an} (10^{-4} c^{-1})$	
	0.3 атм	1 атм
Опухолевые	$6.5 \pm 0.9^*$	$10.1 \pm 2.2^*$
	$5.5 \pm 0.8^{**}$	$7.8 \pm 1.7^{**}$
	$2.6 \pm 0.6^{***}$	$3.6 \pm 0.7^{***}$
Нормальные	6.8 ± 1.5	11.0 ± 2.4

Примечание: * – диаметр капсулы опухоли 1 см, ** – 2 см, *** – 3 см.

идами клетки, отвечающими за синтез АТФ и энергетический баланс клеток. Логично предположить, что с увеличением размера опухоли в её клетках возможно увеличение числа митохондрий, обусловленное потребностью в большем количестве энергии, необходимой для ускоренного деления клеток. На рис.3 приведены спектры поглощения и люминесценции родамина 6G в здоровых и в опухолевых клетках молочной железы. В последних отчетливо наблюдается увеличение оптической плотности красителя, причем с увеличением размера капсулы опухоли рост оптической плотности становится более выраженным. В то же время спектры люминесценции красителя в здоровых и в опухолевых клетках, полученных из капсулы размером 1 см, имеют незначительные различия. С увеличением размера опухоли происходит сдвиг максимума флуоресценции в длинноволновую область.

В процессе капсулообразования состав и структура опухолевых клеток претерпевают значительные измене-

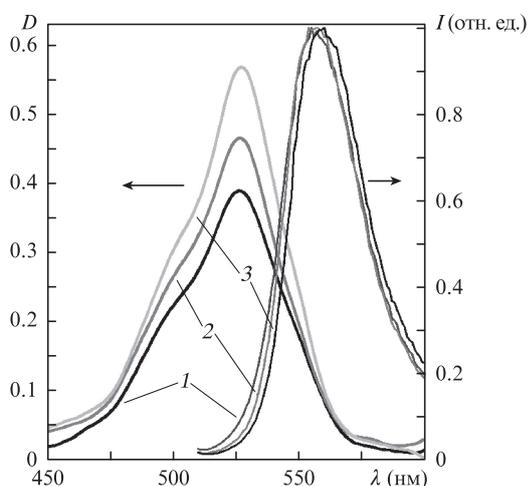


Рис.3. Спектры поглощения и люминесценции родамина 6G в здоровых клетках (1) и в опухолевых клетках, выделенных из капсул опухолей размерами 1 (2) и 3 см (3).

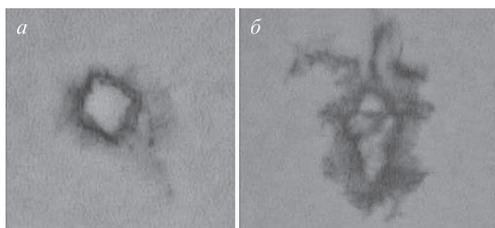


Рис.4. Микрофотографии клетки нормальной ткани молочной железы (а) и клетки, выделенной из капсулы опухоли размером 3 см (б).

ния. Это приводит к полиморфизму ядра и увеличению размеров клеток. На рис.4 представлены фотографии, выполненные методом оптической микроскопии. Отчетливо видны изменения морфометрических показателей клеток. Так, клетка здоровой ткани молочной железы имеет размеры 20×20 мкм и правильную форму. Развитие патологического процесса приводит к увеличению размеров клетки (40×60 мкм) и к диспропорциям в ее форме.

4. Заключение

Несмотря на большое количество экспериментальных и теоретических результатов, полученных при изучении свойств опухолевых клеток, до сих пор многие вопросы остаются спорными и малоизученными. Один из них – концентрация кислорода в опухолевых клетках. В работах [4, 10, 13] приведены данные о более низкой концентрации кислорода в опухолевых клетках, чем в здоровых. Наши результаты согласуются с данными этих научных групп.

В настоящей работе нами исследованы изменения, происходящие в раковых клетках на разных стадиях развития патологии. Стоит отметить, что оптическими методами удается зафиксировать различия в нормальных и опухолевых клетках даже при исследовании опухоли малого размера. Однако спектральные и спектрально-кинетические свойства опухолевых клеток существенно различаются на всех стадиях развития патологического процесса.

Поскольку разработка теорий канцерогенеза продолжается [14–18], данные, приведенные в настоящей работе, могут быть полезны для анализа и корректировки существующих теорий, а также для дальнейшего развития оптических методов биомедицинской диагностики.

Работа выполнена в центре коллективного пользования приборным оборудованием «Институт микро- и нанотехнологий» Оренбургского государственного университета.

- Генина Е.А., Терентюк Г.С., Хлебцов Б.Н., Башкатов А.Н., Тучин В.В. *Квантовая электроника*, **42**, 478 (2012).
- Быков А.А., Индукаев А.К., Приезжев А.В., Мюллер Р. *Квантовая электроника*, **38**, 491 (2008).
- Оптическая биомедицинская диагностика. В 2-х томах.* Пер. с англ. под ред. В.В.Тучина (М.: Физматлит, 2007, т. 2, с. 450).
- Эммануэль Н.М., Кавецкий Р.Е., Тарусов Б.Н., Сидорик Е.П. *Биофизика рака* (Киев: Наукова думка, 1976, с. 287).
- Maryakhina V.S., Letuta S.N. *Laser Phys.*, **23**, 025604 (2013).
- Летута С.Н., Маряхина В.С., Рахматуллин Р.Р. *Квантовая электроника*, **41**, 314 (2011).
- Маряхина В.С., Летута С.Н., Рахматуллин Р.Р., Забиров Р.А. *Способ культивирования клеток.* Патент №2418067 от 10.05.2011 с приоритетом от 03.12.2009.
- Брюханов В.В., Кецле Г.А., Лауринас В.Ч., Левшин Л.В., Мулдаметов З.М. *ЖПС*, **46**, 588 (1987).
- Добрецов Г.Е. *Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов* (М.: Наука, 1989, с. 277).
- Горенков Р.В., Карпов В.Н., Рогаткин Д.А., Шумский В.И. *Биофизика*, **52**, 711 (2007).
- Mastro A.M., Babich M.A., Taylor W.D., Keith A.D. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **81**, 3414 (1984).
- Davis S., Weiss M.J., Wong J.R., Lampidis T.J., Chen L.B. *J. Biol. Chem.*, **260**, 13844 (1985).
- Ivanov A.V., Zakharov S.D. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **4059**, 101 (2000).
- Абелев Г.И. *Биохимия*, **65**, 127 (2000).
- Дейчман Г.И. *Биохимия*, **65**, 92 (2000).
- Клейн Дж., Имрех С., Забаровский Е. *Биохимия*, **73**, 597 (2008).
- Абелев Г.И., Эрайзер Т.Л. *Биохимия*, **73**, 605 (2008).
- Лихтенштейн А.В. *Биохимия*, **74**, 437 (2009).